



⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENTAMT

# Offenlegungsschrift

## ⑯ DE 195 24 515 A 1

⑯ Int. Cl. 6:

**C 07 H 13/00**

C 07 H 15/00

C 07 H 15/18

C 07 H 21/00

⑯ Anmelder:

Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des  
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑯ Vertreter:

Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea  
Schüßler, 81825 München

⑯ Erfinder:

Wießler, Manfred, Prof. Dipl.-Chem. Dr., 69126  
Heidelberg, DE; Beyreuther, Konrad, Prof.  
Dipl.-Chem. Dr., 69120 Heidelberg, DE

⑯ Entgegenhaltungen:

DE	42 36 237 A1
DE	38 35 772 A1
DE	38 29 899 A1
DD	1 23 457
US	44 57 918
EP	04 11 624 A2
EP	03 20 942 A2
WO	95 14 705
WO	94 05 681
WO	85 01 050

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Saccharid-Konjugate

⑯ Die Erfindung betrifft ein Konjugat, umfassend ein Saccharid und einen oder mehrere Wirkstoffe, sowie die Verwendung des Konjugats.

DE 195 24 515 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 98 602 082/318

DE 195 24 515 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Saccharid-Konjugate und ihre Verwendung.

Allgemein besteht bei vielen Wirkstoffen, insbesondere solchen für die Krebstherapie und solchen, die in bestimmte Organe und deren Zellen, z. B. Gehirn, Neurone, Glia-, Astroglia- und andere nicht-neuronale Zellen, gelangen sollen, das Problem, daß diese schlecht an ihren Wirkort transportiert werden und daher erhebliche Nebenwirkungen haben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem Wirkstoffe verschiedenster Art gezielt an ihren Wirkort transportiert werden können, so daß ihre Nebenwirkungen reduziert werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Konjugat, umfassend ein Saccharid und einen oder mehrere Wirkstoffe.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß  $\beta$ -D-Glucose-Isophosphoramid gute anti-Tumor-Eigenschaften bei äußerst geringen Nebenwirkungen im Vergleich zu Cyclophosphoramid und Isophosphoramid hat. Ferner hat er erkannt, daß  $\beta$ -D-Glucose-Isophosphoramid durch einen gerichteten Transport in die Tumorzellen gelangt. Für diesen Transport hat sich ein Glucosetransporter als wesentlich erwiesen.

Auf der Basis vorstehender Erkenntnisse wurden Konjugate entwickelt, in denen ein oder mehrere Wirkstoffe an ein Saccharid, insbesondere ein Monosaccharid, Disaccharid oder Oligosaccharid, gebunden sind. Als Monosaccharid sind insbesondere Glucose, ganz besonders D-Glucose, Galaktose, Mannose, Arabinose, Xylose, Fucose, Rhamnose, 2-Amino-2-deoxyglucose, 2-Fluor-2-deoxyglucose, N-Acetyl-2-amino-2-deoxyglucose, N-Acetyl-2-amino-2-deoxygalaktose, Digitoxose und 2-Amino-2-deoxygalactose zu nennen. Als Disaccharid eignen sich insbesondere Maltose, Laktose oder Gentobiose, entweder 1,4- oder 1,6-verknüpft. Als Oligosaccharid ist insbesondere ein lineares und verzweigtes, z. B. di-, tri-, insbesondere N,N'-Di-2-chlorethyl-(3,6-di-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl)phosphorsäureesterdiamid, und tetraantennäres Oligosaccharid zu erwähnen.

Als Wirkstoff kommen jegliche therapeutisch und/oder diagnostisch verwendbare Substanzen in Frage. Dies sind insbesondere:

Antioxidantien, z. B. Cystein, N-Acetylcystein,  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Probuclol,  $\alpha$ -Liponsäure, Limonen (Perillasäure), Xanthine, Carotinoide und Nitron, Antirheumatika, Antiallergika, Antianämika, Antibiotika, z. B. Sulfonamide, Antidiabetika, Antiemetika, Antihistaminika, Antiepileptika,  $\beta$ -Rezeptorblocker, Calciumantagonisten, ACE-Hemmer, Broncholytika, Antiasthmatische, Cholinergika, Corticoide, Dermatika, Diuretika, Enzyminhibitoren, Gichtmittel, Grippemittel, Sedativa, Immuntherapeutika, Lebertherapeutika, Lipidsenker, Migränemittel, Muskelrelaxantien, Narkosemittel, Neuropathiepräparate, Antihyperkinetika, Psychopharmaka, Schilddrüsentherapeutika, Sexualhormone und ihre Hemmstoffe, Spasmolytika, Vitamine, Wundbehandlungsmittel, Analgetika, z. B. Indometacin, Paracetamol, Ibuprofen und Acetylsalicylsäure, Cimetidin, Tumortherapeutika, z. B. Cyclophosphoramid, Isophosphoramid, cis-Platin-Komplexe, Antimetabolite, wie Methotrexat und 5-Fluoruracildesoxyribosid, und Topoisomeraseinhibitoren, wie Mitoxantron, Tumordiagnostika, Radiosensitizer, z. B. Misonidazol, Inhibitoren der DNA-Reparatur, z. B. O<sup>6</sup>-Benzyldeoxyguanosin,  $\alpha$ -Sympathomimetika, z. B. L-Dopa und Dopamin, Nukleinsäuren, z. B. Oligonukleotide, und Anti-AIDS-Mittel, wie Azidothymidin, Dideoxyinosit und Dideoxycytidin.

Die Bindung zwischen dem Saccharid und dem oder den Wirkstoffen kann in üblicher Weise vorliegen. Günstig ist es, wenn zumindest eine Bindung über die 1-Position des Saccharids vorliegt. Dies hat den Vorteil hat, daß am Wirkort, d. h. in der Zelle, der über die 1-Position des Saccharids gebundene Wirkstoff enzymatisch abgespalten und freigesetzt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats ist das Saccharid zumindest mit einem Wirkstoff über einen üblichen Linker verbunden. Als Linker eignen sich besonders Diole, ganz besonders kurzkettige Diole von 1,2-Diol, z. B. Ethylenglykol, bis 1,6-Hexandiol.

Erfindungsgemäße Konjugate reichern sich in Zellen, Organen und Geweben an, die Glucosetransporter und/oder verwandte Transporter davon aufweisen. Die Konjugate reichern sich insbesondere in Leber, Niere, Herz, Thymus, Schilddrüse, Darm und Gehirn sowie in allen Arten von Tumoren an.

Erfindungsgemäße Konjugate eignen sich daher besonders zur Behandlung neurologischer Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Schlaganfall, Morbus Parkinson und andere Demenzerkrankungen. Hierfür ist es günstig, wenn die Konjugate Antioxidantien als Wirkstoff enthalten. Diese Wirkstoffe verhindern, daß in aeroben Zellen eine unvollständige Reaktion des Sauerstoffs in der mitochondrialen Elektronentransportkette stattfindet und es dadurch zur Freisetzung von Superoxidradikalen, Hydroxylperoxiden oder Hydroxylradikalen ins Cytosol kommt, was zum Zelltod führen kann. Bei Schlaganfall und anderen artherosklerotischen Erkrankungen wird durch die Gabe von Antioxidantien besonders die Oxidation von LDL-Partikeln zu Lipidperoxiden gehemmt, die ein kritisches Ereignis bei der Bildung artherosklerotischer Plaques darstellen. Bei der Behandlung von Morbus Parkinson hat sich außerdem die Verwendung von L-Dopa oder Dopamin als Wirkstoff bewährt.

Erfindungsgemäße Konjugate, die Antioxidantien als Wirkstoffe enthalten, eignen sich ferner zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes, Entzündungen, insbesondere rheumatische Arthritis, entzündliche Darmkrankheiten und Pankreatitis, Bluthochdruck und Lungenerkrankungen, z. B. ideopathische pulmonäre Fibrosis und Cystische Fibrose, AIDS-verursachte Apoptose von CD4-T-Zellen, Atherosklerose, Osteoporose, Ischämie, Katarakt sowie Multiple Sklerose. Ferner eignen sich solche Konjugate auch im Sinne der Vorbeugung gegen vorstehend erwähnte Erkrankungen, insbesondere artherosklerotische Erkrankungen und Morbus Alzheimer.

Des Weiteren können erfindungsgemäße Konjugate, wenn sie entsprechende Wirkstoffe enthalten, erfolgreich zur Therapie bzw. Diagnose von Tumoren verwendet werden. Beispiele von therapeutisch verwendbaren

Wirkstoffen sind Cyclophosphoramid und Isophosphoramid. Weiter sind insbesondere Radiosensitizer, wie Misonidazol, zu nennen, die zu einer tumorspezifischen Verstärkung der einer Radio- und/oder photodynamischen Therapie führen. Desweiteren sind besonders Inhibitoren der DNA-Reparatur, wie O<sup>6</sup>-Benzyldeoxyguanosin, zu erwähnen. Diese Wirkstoffe tragen zur tumorspezifischen Verminderung der DNA-Reparaturkapazität und damit zur Verbesserung einer Therapie durch alkylierende Tumor-Chemotherapeutika bei. Zur Tumorthерапie und Prävention von Tumorerkrankungen eignen sich auch Konjugate, die Antioxidantien enthalten. Durch diese Wirkstoffe wird, wie vorstehend angegeben, die Bildung freier Radikale unterbunden, welche bekanntermaßen zu einer Zellschädigung führen und eine Entartung von Zellen begünstigen. Konjugate mit Antioxidantien können daher auch zum Schutz gesunder Zellen bei Chemo- und Bestrahlungstherapien verwendet werden. Ferner weisen jüngste Ergebnisse des Anmelders darauf hin, daß erfundungsgemäße, Tumorthерапeutika enthaltende Konjugate weit weniger einer Resistenz gegenüber den Tumorthерапeutika unterliegen als diese alleine.

Desweiteren eignen sich erfundungsgemäße Konjugate, die Nukleinsäuren, z. B. Oligonukleotide, als Wirkstoffe enthalten, zur Diagnose und/oder Therapie von Gen-Defekten, insbesondere solchen, die organspezifisch sind.

Darüberhinaus können erfundungsgemäße Konjugate auch zur Bekämpfung von Erregern jeglicher Art eingesetzt werden, die einen Glucosetransporter oder einen damit verwandten Transporter aufweisen. Solche Erreger sind insbesondere Viren, Bakterien und Einzeller. Somit eignen sich erfundungsgemäße Konjugate auch zur Behandlung von durch solche Erreger verursachten Erkrankungen, z. B. virale Infektionen, insbesondere AIDS.

Die Erfahrung wird durch die folgenden Beispiele erläutert.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

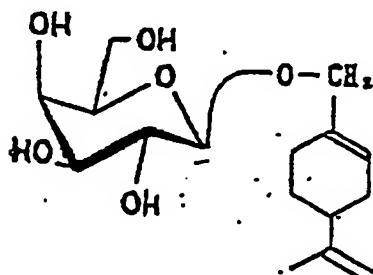
50

### Beispiel 1

#### Herstellung eines erfundungsgemäßen Konjugats, β-D-Galactopyranosid-[4-(1-methylethenyl)-1-cyclohexen-1-yl]methyl

In einem ausgeheizten 500 ml Dreihalskolben wurden unter Lichtschutz 250 ml abs. Diethylether, 7,5 g Silbercarbonat, 25 g fein gepulvertes Molekularsieb (4 Å) und 2,3 ml (0,15 mol) des Antioxidanz S(-)Perillaalkohol 15 Min. gerührt. Dann wurden 6 g (0,15 mol) Tetraacetyl- $\alpha$ -bromgalactose in 100 ml abs. Diethylether in kleinen Portionen während einer Stunde hinzugefügt. Die Reaktion wurde dünnenschichtchromatographisch (Kieselgel PE/Essigester 4 : 1 v/v) verfolgt. Nach 10 Std. wurde das Reaktionsgemisch filtriert und die festen Rückstände mit Aceton gewaschen. Danach wurde mit einer 5% NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen, mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, im Vakuum eingeengt und säulenchromatographisch (Kieselgel PE/Essigester 6 : 1 v/v) gereinigt. Es wurden 3,05 g des Anomerengemisches als farbloses Öl erhalten. Eine HPLC-Chromatographie zeigte ein Produktverhältnis von  $\beta : \alpha = 2,92$ . Die Abspaltung der Acetyschutzgruppen erfolgte in nahezu quantitativer Ausbeute durch Umsetzung mit Triethylamin 1 Std. bei Raumtemperatur.

Das erhaltene Produkt hat die Strukturformel:



### Beispiel 2

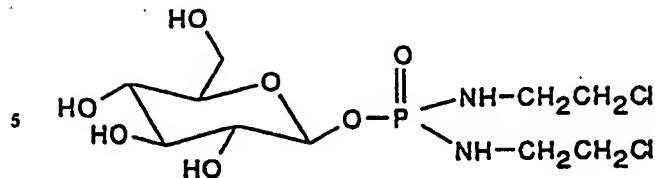
#### Herstellung und Verwendung eines erfundungsgemäßen Konjugats, β-D-Glucosylisophosphorimid (β-D-Glc-IPM)

55

1,0 mM Glycosylimidat wurde in 20 ml Acetonitril gelöst. Nach Zugabe von 1,0 mM Isophosphorimid (Haloxan®) wurde 6 Stunden unter Rückfluß in der Dunkelheit erhitzt. Nach Filtration und Einrotation wurde gemäß üblicher Verfahren an Kieselgel chromatographiert. Das erhaltene β-D-Glc-IPM hat die folgende Strukturformel:

60

65



10 Dieses Konjugat wurde nach üblichen Verfahren mit  $^{14}\text{C}$  markiert und zur nachstehenden Behandlung von Ratten verwendet.

Als Ratten wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten; erhältlich von Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland) und männliche Kopenhagen-Ratten (erhältlich von Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, USA) eingesetzt.

15 Den Kopenhagen-Ratten wurden frische Stücke ( $2 \times 2$  mm) von Dunning-Prostata-Tumorgewebe transplantiert. Die Tumoren ließ man ca. eine Woche wachsen bis diese gut tastbar, aber noch nicht nekrotisch waren.

Gruppen von 5 gesunden SD-Ratten erhielten i.v.-Injektionen von 315 mg/kg  $\beta$ -D-Glc-IPM, bzw. 56,2 mg/kg  $\beta$ -D-Glc IPM. 5 der tumor-tragenden Kopenhagen-Ratten erhielten 31 5 mg/kg  $\beta$ -D-Glc-IPM. Die radioaktive Dosis pro Injektion betrug etwa 20  $\mu\text{Ci}$ . Ein Tier jeder Gruppe wurde mit  $\text{Co}_{2}$  10 Minuten, 1 Std, 2 Std, 8 Std bzw. 20 24 Std. nach Verabreichung der Injektion getötet. Das Gewebe der Ratten wurde für eine übliche Mikrotom-Präparation vorbereitet und die Schnitte wurden wie von Ullberg, S. (1977), In: Alvefeldt, O. (ed.) Special issue on whole-body autoradiographie. Science Tools, Bromma, Sweden, p. 2. beschrieben, einer Autoradiographie unterworfen.

25 Es zeigte sich, daß sich das erfundungsgemäße Konjugat bereits nach 10 Minuten in Organen, insbesondere Leber, Nieren, Thymus und Schilddrüse, angereichert hatte. Zentrales Nervensystem, einschließlich Gehirn, wies das Konjugat nach 8 Stunden auf. Des Weiteren fand sich auch eine starke Anreicherung des Konjugats im Tumorgewebe.

#### Patentansprüche

- 30 1. Konjugat, umfassend ein Saccharid und einen oder mehrere Wirkstoffe.  
 2. Konjugat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Wirkstoff über die 1-Position des Saccharids gebunden ist.  
 3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Saccharid ein Monosaccharid ist.  
 35 4. Konjugat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Monosaccharid ausgewählt ist aus Glucose, Galaktose, Mannose, Arabinose, Xylose, Fucose, Rhamnose, 2-Amino-2-deoxyglucose, 2-Fluor-2-deoxyglucose, N-Acetyl-2-amino-2-deoxyglucose, N-Acetyl-2-amino-2-deoxygalaktose, 2-Amino-2-deoxygalactose und Digitoxose.  
 5. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Saccharid ein Disaccharid ist.  
 40 6. Konjugat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Disaccharid ausgewählt ist aus Maltose, Laktose und Gentobiose.  
 7. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Saccharid ein Oligosaccharid ist.  
 8. Konjugat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Oligosaccharid ein verzweigtes Oligosaccharid, insbesondere N,N'-Di-2-chlorethyl-(3,6-di-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-phosphorsäureesterdiamid ist.  
 45 9. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff ausgewählt ist aus Antioxidantien, Analgetika, Cimetidin, Tumortherapeutika, Tumordiagnostika, Radiosensitizer, Inhibitoren der DNA-Reparatur,  $\alpha$ -Sympathomimetika und Nukleinsäuren.  
 10. Konjugat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Antioxidanz ausgewählt ist aus Cystein, 50 N-Acetylcystein,  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Probabocol,  $\alpha$ -Lipponsäure, Limonen (Perillasäure), Xanthinen, Carotinoiden und Nitronen.  
 11. Konjugat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Analgetikum ausgewählt ist aus Indometacin, Paracetamol, Ibuprofen und Acetylsalicylsäure.  
 12. Konjugat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Tumortherapeutikum ausgewählt ist aus Cyclophosphoramid, Isophosphoramid, cis-Platin-Komplexen, Antimetaboliten und Topoisomeraseinhibitoren.  
 55 13. Konjugat nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß das Saccharid und mindestens ein Wirkstoff über einen Linker verbunden sind.  
 14. Konjugat nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß der Linker aus kurzkettigen Diolen von 1,2-Diol bis 1,6-Hexandiol ausgewählt ist.  
 60 15. Verwendung des Konjugats nach einem der Ansprüche 1-14 zur Diagnose und/oder Therapie.



**DE19524515 (A1)**

## **Unofficial English Abstract**

### **Saccharid-Konjugate**

Publication date: 1997-01-09

Inventor(s): WIESLER MANFRED PROF DIPL CHEM [DE]; BEYREUTHER KONRAD PROF DIPL CH [DE]

Applicant(s): DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]

Classification:

- international: A61K45/08; A61K47/48; A61K49/00; A61K51/04; C07H11/04; C07H15/18; A61K45/00; A61K47/48; A61K49/00; A61K51/02; C07H11/00; C07H15/00; (IPC1-7): C07H13/00; C07H15/00; C07H15/18; C07H21/00

- european: A61K51/04R; A61K47/48H4; A61K47/48H4M4; C07H11/04D; C07H15/18D

Application number: DE19951024515 19950705

Priority number(s): DE19951024515 19950705

## **Abstract**

The invention concerns a conjugate comprising a saccharide and one or a plurality of active substances. The invention also concerns the use of the conjugate.

---

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide